

2/9/1

DIALOG(R)File 351: Derwent WPI.

(c) 2007 The Thomson Corporation. All rights reserved.

0002142473

WPI Acc no: 1981-29439D/198117

Allergen protein extracts of organic materials - are free of enzymes and are used in diagnosis and desensitisation of allergies

Patent Assignee: INST PASTEUR (INSP)

Inventor: HENOCQ E; RELYVEID E H; RELYVELD E H; RELYVELD E R

Patent Family (7 patents, 11 countries)							
Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
EP 27088	A	19810415	EP 1980401424	A	19801006	198117	B
FR 2466991	A	19810508	FR 197924948	A	19791008	198126	E
US 4350686	A	19820921	US 1982392594	A	19820628	198240	E
EP 27088	B	19831214	EP 1980401424	A	19801006	198351	E
DE 3065905	G	19840119				198404	E
CA 1161837	A	19840207				198411	E
US 4552756	A	19851112	US 1982392594	A	19820628	198548	E

Priority Applications (no., kind, date): FR 197924948 A 19791008

Patent Details						
Patent Number	Kind	Lan	Pgs	Draw	Filing Notes	
EP 27088	A	FR				
Regional Designated States,Original		BE CH DE GB IT LI NL SE				
EP 27088	B	FR				
Regional Designated States,Original		BE CH DE GB IT LI NL SE				
CA 1161837	A	EN				

Alerting Abstract EP A

Allergen comprising a proteinic extract of organic material, partic. pollens, flours, house dust, kapok, wool or moulds, is free of enzymes and has all its fractions allergenically active. The extract is free of all cpds. of mol. wt. less than 10,000 or greater than 55,000; and most pref. it has mol. wt. 14,000-45,000, esp. 20,000-44,000..

The allergen is used in diagnosis of allergies and treatment of allergies by desensitisation. They are more active and more stable than known prods. and do not cause secondary reactions when injected. They have prolonged duration of usage and are partic. suitable for adsorption on mineral gels.

Equivalent Alerting Abstract US A

Improved allergenic compsn. for hyposensitising allergic patients by intracutaneous administration, comprises an aq. extract of pollen, flour, house dust, kapok, wool, or moulds contg. only the allergenically-active substances of mol.wt. 10,000-50,000, but as enzymes. Pref. compsn. contains an aq. gel of a mineral cpd. having the allergenic substances adsorbed onto it, which comprises an alumina gel, aluminium phosphate gel, or calcium phosphate gel. Calcium phosphate gel has pondered ratio Ca/F of 1.55-1.90. ADVANTAGE - Allergens are more stable and active and provoke no sec. reactions in the organism with which they are injected. (7pp)

Title Terms /Index Terms/Additional Words: ALLERGEN; PROTEIN; EXTRACT; ORGANIC; MATERIAL; FREE; ENZYME; DIAGNOSE; DESENSITISE; ALLERGIC; POLLEN; FLOUR; HOUSE; DUST; WOOL; KAPOK; MOULD; MOLECULAR; SIEVE; AQUEOUS; MINERAL; GEL

Class Codes

International Patent Classification					
IPC	Class Level	Scope	Position	Status	Version Date
A61K-039/00			Main		"Version 7"
A61K-039/35; A61K-039/36			Secondary		"Version 7<

US Classification, Issued: 424088000, 424091000, 424088000, 424091000

File Segment: CPI

DWPI Class: B04

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B04A; B12-D02; B12-K04

Chemical Indexing

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M902 M423 M781 P431 P433 P733 P831 P832 R000 V751 V752 V753 V754

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 466 991

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 79 24948

(54) Perfectionnement à la préparation d'allergène.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 3). A 61 K 39/35.

(22) Date de dépôt..... 8 octobre 1979.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 16 du 17-4-1981.

(71) Déposant : INSTITUT PASTEUR (Etablissement reconnu d'utilité publique), résidant en France.

(72) Invention de : Edgar Hans Relyveld et Emile Henocq.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Aymard et Coutel,
20, rue Vignon, 75009 Paris.

L'invention concerne la préparation d'allergènes, à laquelle elle apporte un perfectionnement permettant l'obtention de compositions allergéniques améliorées ; ces dernières font également partie de l'invention.

5 L'allergologie a pris une place importante dans la thérapeutique au cours des dernières décennies, et son rôle va en s'amplifiant ; non seulement décèle-t-elle le caractère allergique dans diverses affections anciennes, mais encore est-elle appelée à remédier aux atteintes de ce type, que mul-
10 tiplie la pollution moderne. Aussi, un besoin de bons agents hyposensibilisants existe toujours, malgré la présence sur le marché d'allergènes bien connus, extraits de différentes matières, notamment : de pollens, farines, poussières de mai-
15 son, poils, kapok, plumes, moisissures, etc. Bien que plusieurs préparations, et en particulier des allergènes-retard adsorbés sur des supports minéraux, tels que des gels à base d'alumine par exemple, donnent d'excellents résultats, l'inocuité et la constance d'activité de certains d'entre eux laissent souvent à désirer. La durée d'utilisation de plusieurs extraits aller-
20 géniques, disponibles à l'heure actuelle, est donc limitée dans le temps.

La présente invention apporte un perfectionnement qui rend possible l'obtention d'allergènes beaucoup plus stables, plus actifs, ne provoquant pas des réactions secondaires,
25 dans l'organisme auquel on les injecte. Les allergènes perfectionnés, produits suivant cette invention, ont une durée d'utilisation considérablement prolongée et ils se prêtent particulièrement bien à la préparation de la forme adsorbée sur un gel minéral.

30 L'invention résulte de la mise en lumière d'un phénomène qui était ignoré, dans cette technique, jusqu'à présent : la présence de diverses enzymes dans les extraits allergéniques n'était pas considérée comme défavorable, et l'on a même proposé de la mettre à profit pour classer ou apprécier l'activité
35 (GLEICH G.J. et coll. "Allergy and Clinical Immunology"- Excerpta Medical, Amsterdam, 1977, pages 184 et 213) ; or, l'Institut Pasteur a trouvé qu'au moins certaines de ces enzymes dégradent des protéines constitutives des allergènes. Ainsi, de façon imprévue, les demandeurs ont déterminé la cause de l'
40 instabilité des extraits allergéniques ; ils ont trouvé égale-

ment que les enzymes, responsables de l'attaque des protéines utiles, ainsi que d'autres impuretés, gênent l'adsorption des allergènes sur des adjuvants minéraux. En outre, ces ou certaines de ces enzymes peuvent être la cause de la production
5 d'anticorps, par une réaction de l'organisme contre les impuretés qu'elles constituent dans l'allergène injecté.

Le procédé perfectionné, suivant l'invention, comprend donc l'élimination des enzymes présentes de l'extrait aqueux d'un allergène, aussitôt que possible après la préparation
10 tion de cet extrait. Il s'agit, en effet, de laisser le moins de temps possible à l'attaque des protéines utiles par les protéases du milieu en présence.

Ainsi, le procédé suivant l'invention, qui comprend la préparation d'un extrait aqueux d'allergène, est caractérisé
15 en ce que l'on élimine de cet extrait des substances ne présentant pas l'activité allergénique voulue. Dans une forme d'exécution particulière, on laisse dans la solution seulement les substances allergéniquement actives dont les masses moléculaires vont d'environ 10 000 à 50 000, et surtout de 14 000
20 à 45 000 (par précipitation).

Dans la pratique de l'invention, il est d'ailleurs souhaitable d'effectuer l'opération sus-indiquée sur un extrait déjà débarrassé de différentes autres impuretés ; cela se fait, comme connu, par la précipitation et redissolution des protéi-
25 nes de l'extrait.

L'élimination des fractions inactives, notamment celles dont les masses moléculaires sont inférieures à 10 000 ou à 14 000 et supérieures à 55 000 ou à 45 000, conformément à l'invention, peut être réalisée par tous moyens appropriés,
30 bien connus dans l'art, par exemple des procédés chromatographiques, précipitations fractionnées, électrophorèse, etc. La filtration sur gel rend, dans cette voie, de grands services, aussi décrit-on ci-après, à titre d'exemple non limitatif, le fractionnement d'un extrait de pollen par tamisage moléculaire.

Les méthodes d'extraction de protéine de diverses
35 matières, notamment en vue de la préparation de compositions allergéniques, sont connues, il n'y a donc pas lieu de les décrire ici. On rappelle seulement, à titre d'exemple, un mode opératoire qui convient particulièrement bien et qui a fait
40 l'objet de publications comme celle du brevet français

n° 1 604 135. Cette méthode consiste à traiter 100 g de matière, notamment de pollens, par 1 litre d'une solution de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ à 25 g/l, renfermant 1/10 000 de merthiolate. Après 24 heures d'agitation à + 4°C, la solution est séparée du solide par centrifugation. L'extrait brut, ainsi obtenu, est purifié par précipitation saline, qui consiste à ajouter 604 g de sulfate d'ammonium, cristallisé, à 1 litre de cet extrait, et à laisser en contact, sous agitation, pendant 3 h à +4°C. Le précipité formé est alors séparé par centrifugation et redissous dans une solution de phosphate disodique à 25 g/l contenant 1/10 000 de merthiolate. La solution obtenue est dialysée contre une solution fraîche de phosphate disodique à 25 g/l, toujours additionné de merthiolate.

C'est sur un extrait, c'est-à-dire une solution préparée comme indiqué ci-dessus, à partir du pollen de phléole, qu'ont été effectuées les opérations exposées dans la suite de la présente description.

Cette solution est d'abord soumise à un fractionnement par tamisage moléculaire. Pour cela, on utilise une colonne chromatographique de 35 mm de diamètre et 560 mm de haut; elle est chargée de Sephadex G-100 dont le domaine de fractionnement possible s'étend sur les masses moléculaires de 4 000 à 150 000. Le fractionnement est conduit avec un éluant constitué par une solution de phosphate disodique à 25 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ par litre, renfermant 0,9% de NaCl et 1/10 000 de merthiolate. On opère sur des portions de 5 ml d'extrait, chacune d'elles étant suivie d'un passage du tampon d'élution. On recueille des fractions de 10 ml sur lesquelles on détermine :

- la masse moléculaire de la substance dissoute,
- la présence d'enzymes et
- la réaction sur la peau.

D'autre part, un fractionnement semblable, et les déterminations sus-indiquées, sont effectués sur un extrait du pollen de phléole dans le phosphate disodique, de même concentration, mais non encore purifié par précipitation au sulfate d'ammonium : cette solution est appelée extrait brut dans la suite de la description.

Les résultats de ces essais sont rapportés dans les graphiques et tableaux ci-joints.

Sur la figure 1, on a tracé la courbe d'élution de

l'extrait brut du pollen de phléole : les numéros des fractions de 10 ml sont portés en abscisses, tandis que les ordonnées indiquent l'absorbance à 280 nm. En haut du graphique, sur une ligne parallèle aux abscisses, on note les réactions sur la peau des fractions mélangées depuis la 13ème jusqu'à la 55ème fraction. Les lettres A à F désignent les repères de référence de substances à masses moléculaires connues :

	A - Bleu de dextran	masse mol.	2 000 000
	B - Albumine	" "	65 000
10	C - Ovalbumine	" "	45 000
	D - Lysozyme	" "	14 600
	E - Bacitracine	" "	1 450
	F - DNP éthanolamine	" "	227

La réaction de la peau est déterminée par la méthode connue de pique ("prick"), qui consiste à mettre une goutte de liquide sur la peau et piquer à travers cette goutte avec une aiguille ; après 20 minutes environ, un sujet allergique donne une réaction positive, notée +, c'est-à-dire une papule et un érythème. Un seul + signifie que la papule s'étend sur un diamètre moyen de 5 mm ; le nombre des + indique le multiple des 5 mm observés.

Dans le cas de l'extrait brut de la figure 1, on constate une réaction de la peau pour les fractions réunies n° 16 à 29, (++) , 30 à 34 (+) et 35 à 44 (+) : il n'y a pas de réaction avant la fraction 15, ni après la fraction 45, ce qui signifie qu'en dehors des fractions 16 à 44, il n'y a plus de produit intéressant en tant qu'allergène. Le domaine utile va donc du n° 16 au n° 44.

Sur la figure 2, on voit le diagramme d'élution ———, analogue à celui de la figure 1, mais appliqué à l'extrait du pollen de phléole préalablement purifié par précipitations au sulfate d'ammonium et redissolution dans une solution de phosphate disodique ; ce sont donc presque uniquement les protéines qui sont ainsi soumises à la séparation par tamisage moléculaire. Sur ce graphique, la série de rectangles verticaux représentent les seules fractions intéressantes qui donnent des réactions + à +++ sur la peau d'allergiques, déterminées par la méthode de pique. Les hauteurs des rectangles sont proportionnelles au diamètre des papules formées sur la peau : 25 mm de hauteur correspondent à 5 mm de diamètre de

papule. Le domaine utile comprend les fractions n° 25 à 38, correspondant sensiblement aux masses moléculaires de 44 000 à 20 000. On retrouve donc ici les indications fournies par l'extrait brut de la figure 1, avec cependant un resserrement du domaine utile.

Conformément à l'invention, dans le cas présent, donné à titre d'exemple, on recueille seulement les fractions n° 25 à 38 pour la préparation de la composition allergénique, tandis que les autres fractions sont rejetées, contrairement à ce qui se pratiquait antérieurement.

La preuve que les fractions 25 à 38 retenues ne contiennent pratiquement pas d'enzymes est apportée par des déterminations effectuées par la méthode très pratique, connue sous le nom de système "API ZYM". Cette méthode consiste à introduire dans une série de 20 cupules, dont le fond est constitué d'un support contenant le substrat enzymatique avec son tampon, une petite quantité de liquide à étudier et à faire réagir, après incubation, ce liquide avec deux réactifs, le tris(hydroxy-méthyl)-amino-méthane et le bleu rapide BB. La présence d'enzymes se manifeste par la coloration qui apparaît dans les cupules et que l'on note sur une échelle de 1 à 5, ce dernier chiffre correspondant au maximum d'intensité. A l'aide de ce système, certains auteurs ont pu trouver la présence de nombreuses enzymes dans des extraits de pollen de graminées ; ainsi, Jean Bousquet et col. ont fait des mesures (Annals of Allergy, vol. 41, sept. 1978, p.164-169) concernant toute une série d'enzymes, telles que phosphatases, estérases, lipases, leucine-amino-peptidase, valine-amino-peptidase, trypsine, chymotrypsine, bêta-glucose-aminidase, des glucosidases, etc.

En appliquant le système API ZYM aux produits des figures 1 et 2, ci-dessus décrites, on a trouvé les résultats rapportés dans le tableau 1 qui suit. Ce tableau donne pour les 20 cupules du système API la note (de 0 à 5) déterminée par comparaison de l'échelle colorée du système avec la teinte développée dans la cupule. Les lettres "tr" signifient "trace". Les essais sont bien entendu accompagnés d'un échantillon témoin formé par une solution de phosphate disodique à 25 g/l contenant du merthiolate, et un extrait chauffé de pollen.

Il résulte des données du tableau 1 que l'extrait brut contient nettement des enzymes et que la teneur en celles-

ci est un peu diminuée du fait de la purification au sulfate d'ammonium. Les enzymes disparaissent pratiquement tout à fait à la suite du fractionnement par filtration sur ^{gel} ; il n'en reste pratiquement plus à partir de la 22ème fraction ; on en
 5 trouve, par contre, dans les fractions 14 à 18 dépourvues d'activité allergénique. (Voir Tableau 1, à la page 8).

On a signalé plus haut que l'élimination des composants de masses moléculaires inférieures à 14 000 et supérieures à 45 000 améliore également l'adsorption de l'allergène
 10 par des gels minéraux. Ainsi peut-on constater que les fractions utiles, séparées suivant la figure 2, s'adsorbent mieux sur les adsorbants connus, tels que par exemple alumine, phosphate d'alumine ou phosphate de calcium. L'adsorption est particulièrement efficace pour le phosphate spécial dans lequel le rap-
 15 port pondéral Ca/P est compris entre 1,55 et 1,90, comme décrit dans le brevet français n° 72 12036 (publication 2.181 426 du 7.12.1973).

Un tel gel est préparé notamment par mélange d'une solution de 25 g de phosphate disodique dans 1 litre d'eau, avec 2/10 000
 20 de merthiolate, additionnée de 20 ml de l'extrait allergénique, préparé à partir de 100 g de pollen, comme indiqué au début de la présente description. Au mélange obtenu, on ajoute 1 litre d'eau renfermant 10,2 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Cette addition est effectuée très rapidement sous agitation et le pH du milieu est
 25 amené à 6,8-7 au moyen de la soude normale.

Dans une première série d'essais, on a déterminé, par la méthode de la piqure mentionnée plus haut, la réaction sur la peau de 11 patients. Pour chacun d'eux, on a utilisé un extrait de phléole purifié par précipitation au sulfate d'am-
 30 monium et - d'autre part- le liquide surnageant après la précipitation du phosphate de calcium spécial en présence du même extrait, comme on vient de l'indiquer. Dans les deux cas, la dilution de l'extrait est de 1/1000. Les résultats sont encore indiqués au moyen de + dont chacun correspond à 5 mm de pa-
 35 pule formée sur la peau du patient.

(Voir tableau 2, à la page 9).

On voit que l'adsorption a été très efficace, puisque la diminution de la réaction sur la peau globale a été de

$$\frac{(22-8,5)}{22} = 61,4\%$$

Des essais similaires ont été effectués avec le même phosphate de calcium spécial mélangé non plus avec l'extrait total de phléole, mais avec les fractions dépourvues d'enzymes, représentées et décrites à propos de la figure 2.

- 5 Les réactions sur la peau ont été déterminées à des dilutions allant de 1/1 000 à 1/1 000 000, le tableau 3 en donne les résultats comparés d'une part, pour l'extrait, c'est-à-dire les fractions elles-mêmes, et, d'autre part, sur le liquide sur-nageant après la précipitation du phosphate. Pour la dilution
- 10 de 1/1 000, la réaction est déterminée par la méthode de la pi-qûre, tandis qu'elle l'est par intradermoréaction, pour les autres dilutions.

(Voir tableau 3, à la page 10).

- On voit que l'adsorption de l'extrait de phléole
- 15 fractionné est très poussée.

Des résultats similaires sont obtenus avec des extraits obtenus à partir d'autres pollens, notamment ceux du seigle, de l'ivraie, de dactyle, etc.

TABLEAU 1

Echantillon	Concentration	Numéros des cupules																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Témoin					tr	tr							tr								
Extrait brut, total (fig.1)	1/100	5	~5	3	tr	4	3	3	3	3	tr	>5	>5	2				3		1	
Extrait purifié au sulf. d'NH ₄ total (fig.2)	1/100	4	3	2		3		1				5	5							1	
d° fractions 14 à 18	1/34,5	≤1	3	1		3						5	4							tr	
d° fraction 15	1/100		1	tr								5	2							tr	
d° fraction 22	1/100		1	tr								1	1								
d° fraction 24	1/100		0,5	tr								tr	1								
d° fraction 26	1/100		tr	tr									1								
d° fraction 29	1/100		tr	tr									1								
d° fraction 31	1/100		tr	tr									1								
d° fraction 31	1/7		1	≤1									tr								

TABLEAU 1 (suite)

Echantillon	Concentration	Numéros des cupules																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
d° fraction 51	1/100			tr	tr								1								
d° fraction 56	1/100			tr	tr								1								

TABLEAU 2

n° patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Total
extraït	++	+	+++	++	+++	++	+	+++	+	++	++	22
surnageant	+	0	+	±	++	±	±	+	0	++	±	8,5

REVENDEICATIONS

1. Allergène constitué par un extrait protéinique d'une matière organique, en particulier pollens, farines, poussière de maison, de kapok, de laine ou de moisissures, caractérisé en ce qu'il est dépourvu d'enzymes et que toutes ses fractions sont allergéniquement actives.
- 5 2. Allergène suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il contient seulement des substances de masse moléculaire se situant entre 10 000 et 55 000, surtout entre 14 000 et 45 000 et mieux dans les limites de 20 000 à 44 000.
- 10 3. Allergène adsorbé sur un gel aqueux minéral, en particulier sur un gel d'alumine, de phosphate d'aluminium ou de phosphate de calcium, caractérisé en ce qu'il présente les particularités suivant la revendication 1 ou 2.
- 15 4. Allergène adsorbé sur un phosphate de calcium, dans lequel le rapport pondéral Ca/P est de 1,55 à 1,90 et, de préférence, 1,62 à 1,85, caractérisé en ce qu'il présente les particularités suivant la revendication 1 ou 2.
- 20 5. Procédé pour la préparation d'un extrait allergénique aqueux, caractérisé en ce que la solution aqueuse séparée du solide, dont on a extrait l'allergène, est fractionnée, de façon à en éliminer les substances allergéniquement inactives et particulièrement les enzymes.
- 25 6. Procédé suivant la revendication 5, caractérisé en ce que l'élimination porte sur les substances de masses moléculaires inférieures à 14 000 et supérieures à 45 000, initialement présentes dans la solution.
7. Procédé suivant la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce que l'élimination des substances non actives est effectuée par tamisage moléculaire.
- 30 8. Procédé suivant la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que seules les substances de masses moléculaires de 20 000 à 44 000 sont retenues pour constituer l'allergène.
- 40 9. Application de l'allergène suivant une des revendications 1 à 4 qui consiste à utiliser ces allergènes au diagnostic des allergies et traitement de désensibilisation des allergies.



